

## Susu UHT (*Ultra High Temperature*)



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	1
5 Klasifikasi.....	2
6 Syarat mutu.....	2
7 Pengambilan contoh .....	2
8 Cara uji .....	3
9 Syarat lulus uji.....	3
10 Higiene.....	3
11 Pengemasan.....	3
12 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji susu UHT.....	4
Bibliografi.....	23



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Susu UHT (Ultra High Temperature)* ini merupakan revisi dari SNI 01-3950-1998 Susu UHT. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
9. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan atau revisinya.
10. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.03.1.23.11.11.09909 Tahun 2011 tentang Pengawasan Klaim dalam Label dan Iklan Pangan Olahan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1 Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 7 Maret 2012 di Bogor. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 13 Juli 2012 sampai dengan tanggal 11 September 2012 dan pemungutan suara pada tanggal 24 Mei 2013 sampai 23 Juli 2013 dengan hasil akhir RASNI.



## Susu UHT (*Ultra High Temperature*)

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, klasifikasi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji untuk susu UHT (*Ultra High Temperature*).

### 2 Acuan normatif

Untuk acuan normatif tidak bertanggal edisi terakhir yang digunakan (termasuk revisi dan amandemennya).

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **susu UHT**

produk susu yang diperoleh dari susu segar, dan atau susu rekonstitusi, dan atau susu rekombinasi dengan cara memanaskan pada kondisi *ultra high temperature*, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan, serta dikemas secara aseptik untuk mencapai sterilitas komersial

#### 3.2

##### **susu segar**

cairan yang berasal dari ambung sapi sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali pendinginan

#### 3.3

##### **susu rekonstitusi**

susu cair yang disiapkan dengan penambahan air pada susu bubuk berlemak (*full cream*) atau susu bubuk skim atau susu bubuk rendah lemak

#### 3.4

##### **susu rekombinasi**

susu cair yang dihasilkan dari campuran komponen susu (susu skim, krim) dan air atau susu atau keduanya

### 4 Komposisi

#### 4.1 Bahan baku utama

Susu segar dan atau susu rekonstitusi, atau susu rekombinasi.

#### 4.2 Bahan pangan lainnya

Bahan pangan yang diijinkan untuk susu UHT sesuai dengan ketentuan yang berlaku.



### 4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk susu UHT sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

## 5 Klasifikasi

Pengklasifikasian susu UHT didasarkan pada kadar lemak yaitu:

- Susu UHT Berlemak (*Full Cream*)
- Susu UHT Rendah Lemak (*Low Fat Milk*)
- Susu UHT Bebas Lemak (*Free Fat Milk*)

## 6 Syarat mutu

Syarat mutu susu UHT sesuai Tabel 1 dibawah ini.

**Tabel 1 – Syarat mutu susu UHT**

No	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan		
			Berlemak ( <i>Full Cream</i> )	Rendah Lemak ( <i>Low Fat Milk</i> )	Bebas Lemak ( <i>Free Fat Milk</i> )
1.	Keadaan				
1.1	Warna	-	klas, normal	klas, normal	klas, normal
1.2	Bau	-	klas, normal	klas, normal	klas, normal
1.3	Rasa	-	klas, normal	klas, normal	klas, normal
2	Protein (N x 6,38)	%, b/b	Min. 2,7 Min.2,0*)	Min. 2,7 Min. 2,0*)	Min. 2,7 Min. 2,0*)
3	Lemak	%, b/b	Min. 3,0 / Min. 2,0*)	0,6-2,9/ 0,6-1,9*)	Maks. 0,5/ Maks. 0,5*)
4	Total padatan tanpa lemak	%, b/b	Min. 8,0	Min. 8,0	Min. 8,0
5	Cemaran logam				
5.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2	Maks. 0,2	Maks. 0,2
5.2	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 0,02	Maks. 0,02	Maks. 0,02
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0	Maks. 40,0	Maks. 40,0
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03	Maks. 0,03	Maks. 0,03
6	Cemaran arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,1	Maks. 0,1	Maks. 0,1
7	Aflatoksin (M1)	µg/kg	Maks. 0,5	Maks. 0,5	Maks. 0,5
8	Cemaran mikroba				
8.1	Angka Lempeng Total	Koloni/ 0,1 mL	< 10	< 10	< 10
<b>CATATAN:</b> *) untuk susu berperisa					

## 7 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.



## 8 Cara uji

Cara uji untuk semua parameter mutu susu UHT seperti di bawah ini:

- a) cara uji persiapan contoh sesuai Lampiran A1;
- b) cara uji keadaan sesuai Lampiran A2;
  - cara uji warna sesuai Lampiran A.2.1;
  - cara uji bau sesuai Lampiran A.2.2;
  - cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3;
- c) cara uji protein sesuai Lampiran A.3;
- d) cara uji lemak sesuai Lampiran A.4;
- e) cara uji total padatan tanpa lemak sesuai Lampiran A.5;
- f) cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran A.6;
  - cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai dengan Lampiran A.6.1;
  - cara uji timah (Sn) sesuai dengan Lampiran A.6.2;
  - cara uji merkuri (Hg) sesuai dengan Lampiran A.6.3;
- g) cara uji cemaran arsen (As) sesuai dengan Lampiran A.7;
- h) cara uji aflatoksin (M1) sesuai dengan Lampiran A.8;
- i) cara uji cemaran mikroba sesuai dengan Lampiran A.9.

## 9 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

## 10 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## 11 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 12 Syarat penandaan

- 12.1 Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.
- 12.2 Untuk klaim rendah lemak dan bebas lemak sesuai dengan ketentuan BPOM tentang Pengawasan Klaim dalam Label dan Iklan Pangan Olahan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji susu UHT**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik dan uji kimia. Pengambilan contoh uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan susu UHT dan ambil contoh secukupnya sesuai yang diperlukan minimum 350 mL secara aseptik dengan menggunakan sendok steril dan kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia**

Buka kemasan contoh susu UHT dan ambil secukupnya sesuai yang diperlukan minimum 350 mL secara hati-hati dengan cara menuangkan contoh ke dalam botol contoh yang bersih dan kering. Jika ukuran kemasan kurang dari 350 mL, maka ambil beberapa kemasan sehingga susu UHT menjadi 350 mL.

**A.2 Keadaan****A.2.1 Warna****A.2.1.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 mL dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh uji apakah ada debu, kotoran dan bahan berbahaya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak terdapat debu, kotoran dan bahan berbahaya, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terdapat debu, kotoran dan bahan berbahaya, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**A.2.2 Bau****A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.



#### A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

#### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tercium bau khas susu UHT, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika tercium selain bau khas susu UHT, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

### A.2.3 Rasa

#### A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

#### A.2.3.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

#### A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- Jika terasa khas susu UHT, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika tidak terasa khas susu UHT, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

### A.3 Protein ( $N \times 6,38$ )

#### A.3.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan  $H_2SO_4$  menggunakan  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  sebagai katalis dan  $K_2SO_4$  untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi  $NH_3$  pada saat destilasi menggunakan  $NaOH$ .  $NH_3$  yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,38 ( $N \times 6,38$ ).

#### A.3.2 Peralatan

- Labu Kjeldahl 100 mL;
- distilator dan kelengkapannya;
- pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- buret 10 mL terkalibrasi; dan
- batu didih

#### A.3.3 Pereaksi

- asam sulfat,  $H_2SO_4$  pekat bebas nitrogen;
- larutan katalis tembaga,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  bebas nitrogen 0,05 g/mL  $H_2O$ ;



- larutkan 5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan air suling menjadi 100 mL, lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas;
- katalis selen  
campurkan 4 g serbuk  $\text{SeO}_2$ , 150 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
  - kalium sulfat,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  bebas nitrogen;
  - batu didih;
  - larutan *indicator methyl red* (MR) dan *bromocresol green* (BCG);  
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 mL. Larutkan 1 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas.
  - larutan asam borat,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;  
larutkan 40 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dengan air suling menjadi 1 000 mL dan tambahkan 3 mL larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
  - larutan natrium hidroksida,  $\text{NaOH}$  30 %;  
larutkan 600 g hablur  $\text{NaOH}$  dengan air suling menjadi 2 000 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
  - larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %; dan  
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 %, dan encerkan menjadi 100 mL.
  - larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  0,1 000 M.  
pipet dengan hati-hati 8,60 mL  $\text{HCl}$  pekat (36,5 % sampai dengan 38 %) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan tentukan normalitasnya.

#### A.3.4 Cara kerja

- timbang 1 g contoh ke dalam labu Kjeldahl, tambahkan 15,00 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1 mL larutan katalis  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit penghisapan asap;
- biarkan dingin, lalu encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 mL larutan  $\text{NaOH}$  30 % (periksa dengan indikator PP sehingga larutan menjadi basa;
- sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampungan destilat adalah 50 mL larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan  $\text{HCl}$  0,100 0 M; dan
- kerjakan penetapan blanko.

#### A.3.5 Perhitungan

$$\text{Protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,38 \times 100\%}{W}$$

##### Keterangan:

- $V_1$  adalah volume  $\text{HCl}$  0,100 0 M untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam milliliter (mL);  
 $V_2$  adalah volume  $\text{HCl}$  0,100 0 M untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam milliliter (mL);  
 $N$  adalah normalitas larutan  $\text{HCl}$ ;  
 $W$  adalah bobot contoh, dinyatakan dalam milligram (mg);  
 14,007 adalah bobot atom nitrogen;  
 6,38 adalah faktor protein untuk susu.



### A.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.4 Lemak

### A.4.1 Prinsip

Lemak dalam contoh dihidrolisis dengan ammonia dan alkohol kemudian diekstraksi dengan eter. Ekstrak eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dalam pinggan alumunium dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

### A.4.2 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) pipet volumetrik 25 mL;
- c) penangas air;
- d) labu ekstraksi atau labu lemak *Mojonnier*;
- e) sentrifuse;
- f) oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- g) desikator yang berisi desikan;
- h) pinggan alumunium;
- i) gelas ukur;
- j) tang/penjepit; dan
- k) tutup labu.

### A.4.3 Pereaksi

- a) air suling;
- b) ammonium hidroksida pekat;
- c) indikator fenolftalein (pp) 0,5 %;
- d) etil alkohol 95 %;
- e) etil eter, bebas peroksida; dan
- f) petroleum eter.

### A.4.4 Cara kerja

- a) timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) susu UHT ke dalam labu ekstraksi; tambahkan 10 mL air suling, aduk hingga membentuk pasta, dan panaskan jika diperlukan;
- b) tambahkan 1 mL sampai dengan 1,25 mL ammonium hidroksida pekat, panaskan dalam penangas air pada suhu 60 °C sampai dengan 70 °C selama 15 menit, diaduk beberapa kali dan didinginkan.
- c) tambahkan 3 tetes indikator fenolftalein, 10 mL alkohol 95 %, tutup labu ekstraksi, dan aduk selama 15 detik.
- d) untuk ekstraksi pertama; tambahkan 25 mL etil eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- e) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- f) tambahkan 25 mL petroleum eter, tutup labu ekstraksi dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- g) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;



- h) sentrifuse labu tersebut pada 600 rpm selama 30 detik sehingga terjadi pemisahan fasa air (*bright pink*) dan eter dengan jelas;
- i) tuangkan lapisan eter dengan hati-hati ke dalam labu lemak atau pinggan alumunium kosong yang telah diketahui bobotnya ( $W_0$ );
- j) lapisan air digunakan untuk ekstraksi berikutnya;
- k) untuk ekstraksi kedua, ulangi cara kerja c sampai dengan j dengan penambahan 5 mL alkohol 95 %, 15 mL etil eter dan 15 mL petroleum eter;
- l) untuk ekstraksi ketiga, ulangi cara kerja c sampai j dengan tanpa penambahan alkohol 9 %, 15 mL etil eter dan 15 mL petroleum eter;
- m) uapkan pelarut di atas penangas air dan keringkan labu lemak/pinggian alumunium yang berisi ekstrak lemak tersebut dalam oven bersuhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 30 menit atau oven vakum pada suhu  $70 ^\circ\text{C}$  sampai dengan  $75 ^\circ\text{C}$  dengan tekanan  $< 50 \text{ mmHg}$  (6,7 Kpa); dan
- n) dinginkan dalam desikator dan timbang hingga bobot tetap ( $W_1$ ).

#### A.4.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100\%$$

##### Keterangan:

- W adalah bobot contoh yang diuji, dinyatakan dalam gram (g).
- $W_0$  adalah bobot labu lemak/pinggian alumunium kosong, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_1$  adalah bobot labu lemak/pinggian alumunium kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g);

#### A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.5 Total padatan tanpa lemak

#### A.5.1 Prinsip

Total padatan tanpa lemak dihitung sebagai bobot contoh yang tersisa setelah pemanasan dalam oven pada suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 4 jam dikurangi kadar lemak.

#### A.5.2 Peralatan

- a) pinggan untuk menimbang berdiameter 5 cm;
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) penangas air;
- d) desikator berisi silika;
- e) tang/penjepit; dan
- f) oven terkalibrasi.

#### A.5.3 Cara kerja

- a) timbang pinggan kosong yang sebelumnya telah dipanaskan di dalam oven  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $\geq 2$  jam ( $W$ ). Timbang juga 1 pinggan kosong sebagai blanko ( $B_1$ ), kemudian pinggan kosong dipanaskan pada oven suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $\geq 2$  jam sebagai blanko ( $B_2$ );



- b) timbang 3 g contoh (yang sudah dipanaskan pada  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  ke dalam pinggan tadi ( $W_1$ );
- c) masukkan pinggan berisi contoh ke dalam oven dan keringkan selama 4 jam pada suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  (selama pengeringan pintu oven jangan dibuka); dan
- d) pindahkan pinggan dalam desikator dan biarkan dingin pada suhu kamar (30 menit) kemudian timbang ( $W_2$ ).

#### A.5.4 Perhitungan

$$\text{Total padatan (\%)} = \frac{(W_1 - W_2) - (B_1 - B_2)}{W_1 - W} \times 100\%$$

##### Keterangan :

- W adalah bobot pinggan, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_1$  adalah bobot pinggan + contoh susu, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_2$  adalah bobot pinggan + susu kering, dinyatakan dalam gram (g);
- $B_1$  adalah bobot blanko sebelum dipanaskan, dinyatakan dalam gram (g);
- $B_2$  adalah bobot blanko sesudah dipanaskan, dinyatakan dalam gram (g);

$$\text{Total padatan tanpa lemak (\%)} = \text{total padatan (\%)} - \text{lemak (\%)}$$

#### A.6 Cemaran logam

##### A.6.1 Penetapan cemaran kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

###### A.6.1.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada  $500 ^\circ\text{C}$  yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

###### A.6.1.2 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL;
- c) penangas listrik;
- d) kertas Whatman No 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ;
- f) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi ;
- h) labu ukur 50 mL , 100 mL, dan 1 000 mL terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 10 mL;
- j) gelas piala 250 mL; dan
- k) penangas air.

###### A.6.1.3 Pereaksi

- a) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat (65 %, bj 1,4);
- b) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat (37 %, bj 1,19);
- c) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
encerkan 7 mL  $\text{HNO}_3$  65 % pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.



- d) larutan asam klorida, HCl 6 N;  
encerkan 500 mL HCl pekat 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- e) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 % dalam alkohol;  
larutkan 10 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dengan alkohol 95 % menjadi 100 mL.
- f) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dengan gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- g) larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
Pipet 10 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- h) Larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
Pipet 10 mL larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- i) Larutan baku kerja Cd;  
Pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL ; 0,5 mL ; 1 mL ; 2 mL ; 4 mL ; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$  ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$  ; 0,2  $\mu\text{g/mL}$  ; 0,4  $\mu\text{g/mL}$  ; 0,8  $\mu\text{g/mL}$  ; 1,4  $\mu\text{g/mL}$  ; dan 1,8  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- j) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- k) larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/mL}$ .
- l) larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,0  $\mu\text{g/mL}$  Pb.

#### A.6.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/ platina/ kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (500 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N dan 10 mL  $\text{HNO}_3$  0,1 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 sampai 3 menit (sampai kering), dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tetapkan hingga tanda garis dengan air suling (V); (jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring);



- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA (pada panjang gelombang maksimal 324,7 nm untuk Cu dan 217 nm untuk Pb);
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

#### A.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi logam } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.6.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam timbal (Pb). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

#### A.6.2 Penetapan Timah (Sn)

##### A.6.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O-C}_2\text{H}_2$ .

##### A.9.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- c) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) penangas listrik;
- e) penangas air;
- f) labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikroburet terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) gelas ukur 50 mL; dan
- j) gelas piala 250 mL.

##### A.6.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air menjadi 100 mL.
- b) asam nitrat pekat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- c) asam klorida pekat,  $\text{HCl}$  pekat;



- d) larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan  
larutkan 1,000 mg Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

#### A.6.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO<sub>3</sub> pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl<sub>2</sub> berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.

#### A.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn)} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.6.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.



### A.6.3 Penetapan Merkuri (Hg)

#### A.6.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

#### A.6.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- labu ukur 100 mL, 500 mL, dan 1 000 mL terkalibrasi;
- penangas listrik;
- gelas ukur 25 mL; dan
- pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikroburet terkalibrasi.

#### A.6.3.3 Pereaksi

- asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 M;
- asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 M;
- batu didih;
- campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- larutan natrium molibdat,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 %;
- larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
pipet 1 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- larutan baku kerja Hg;  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.



#### A.6.3.4 Cara kerja

##### A.6.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

##### A.6.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh basah (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.



### A.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

#### Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

### A.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.7 Cemarkan arsen (As)

### A.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

### A.7.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG") terkalibrasi;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu *Kjeldahl* 250 mL;
- labu ukur 50 mL, 100 mL, 500 mL, dan 1 000 mL terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- cawan porselen 50 mL;
- gelas ukur 25 mL;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- labu berbahan borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- microwave digester*;
- burner* atau *bunsen*; dan
- gelas piala 200 mL.

### A.7.3 Pereaksi

- asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  4 %;  
 larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis kedalam labu ukur 500 mL.
- larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
 larutkan 66 mL  $\text{HCl}$  pekat 37 % kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;



timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- f) larutan kalium iodida, KI 20 %;  
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
Larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- h) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1 000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  As.
- j) larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan baku As 100  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
- k) larutan baku kerja As.  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.
- l) asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;

#### A.7.4 Cara kerja

##### A.7.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu Kjeldahl 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 10 mL  $\text{HClO}_4$  70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat),
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL amonium oksalat  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan



n) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.7.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh basah (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 10 mL HNO<sub>3</sub>, 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 5-10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450 °C (± 1 jam);
- dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 %, kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan NaBH<sub>4</sub> dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan cemaran arsen (As) } \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi cemaran As dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

#### A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.8 Aflatoksin

#### A.8.1 Prinsip

Aflatoksin M<sub>1</sub> dipisahkan dengan diekstraksi secara selektif menggunakan *Immuno Affinity Column* (IAC) yang mengandung antibody spesifik. Antibodi akan secara selektif mengikat aflatoksin M<sub>1</sub> (antigen) yang terkandung dalam ekstrak untuk membentuk kompleks antibodi-antigen. Komponen lainnya dicuci dari kolom dengan menggunakan air. Aflatoksin M<sub>1</sub> dari kolom dielusi dengan asetonitril, setelah eluat dijadikan konsentrat, jumlah aflatoksin M<sub>1</sub> ditetapkan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor fluorometrik.



### A.8.2 Peralatan

- Seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor fluoresen dan kolom (Octadecylsilane (ODS, ODS-1, ODS-2, ODS Hypersil, Nucleosil C18/ Cromospher C18/Nova-pak C18/LiChrosorb RP18/Nova-Pak C18/Microsphere C18 dengan dimensi (mm): 100 x 2,3; 4,6; 5; 125x4; 200x2,1; 3; 4; 250 x 4,6;);
- vakum manifold;
- penangas air;
- sentrifuse;
- magnetic stirrer*;
- gelas piala 200 mL;
- Immuno Affinity Column (IAC)*;
- pipet volumetrik terkalibrasi;
- labu ukur 50 mL terkalibrasi;
- tabung bertutup ulir 5 dan 10 mL;
- mikrosiring 100, 250, dan 500  $\mu\text{L}$ ;
- kertas saring standar kromatografi Whatman no.4, atau setara; dan
- vorteks.

### A.8.3 Pereaksi

- Phosphate Buffer Saline*, PBS;
  - natrium klorida, NaCl p.a;
  - nitrogen;
  - kloroform;
  - asetonitril;
  - metanol;
  - ultrapure water;
  - asam nitrat;
  - deionized water;
  - potassium bromide; dan
  - larutan standar aflatoksin M1 1  $\mu\text{g/mL}$ ;
  - larutan baku kerja aflatoksin 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ;
- dengan menggunakan siring, injek 50  $\mu\text{L}$  larutan standar aflatoksin M1 (k) ke dalam vial coklat dan keringkan dengan nitrogen. Larutkan residu dengan 500 mL asetonitril, tutup rapat, vorteks dan simpan pada suhu 4 °C (larutan stabil dalam 1 bulan);
- larutan baku kalibrasi;
- siapkan larutan baku kerja (l) hingga suhu ruang. Buat larutan deret baku dengan konsentrasi sesuai volume yang diinjek misal 0,05-1,0  $\mu\text{g}$  aflatoksin M1.

### A.8.4 Cara Kerja 1 (tanpa derivatisasi)

#### A.8.4.1 Persiapan larutan contoh

- Hangatkan susu sebelum diuji pada suhu 37 °C dengan waterbath;
- homogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* untuk memisahkan lapisan lemak;
- sentrifuse susu pada kecepatan 2 000 xg untuk memisahkan lemak dan membuang lapisan tipis diatas lemak;
- saring dengan satu atau lebih kertas saring hingga diperoleh filtrat minimal 50 mL;
- siapkan IAC hingga mencapai suhu ruang;
- elusikan 50 mL filtrat (Vs) ke dalam IAC dengan laju alir 2 mL/menit - 3 mL/menit (gunakan vakum manifold);
- cuci IAC dengan 20 mL air dengan laju alir tetap;
- keringkan IAC dengan menggunakan gas nitrogen;



- i) elusikan standar aflatoksin M1 ke dalam IAC dengan 4 mL asetronitril murni;
- j) biarkan asetronitril kontak dengan IAC selama 60 detik;
- k) tampung hasil elusi metanol (eluat) dari IAC; dan
- l) evaporasi eluat sampai kering dengan menggunakan gas nitrogen; dan
- m) cairkan sampai volume ( $V_f$ ) dengan campuran larutan yang digunakan untuk fase gerak, misalnya 200  $\mu\text{L}$  (untuk 50  $\mu\text{L}$  injeksi) sampai 1000  $\mu\text{L}$  untuk 250  $\mu\text{L}$  injeksi).

#### A.8.4.2 Cara penetapan

Injek larutan standar aflatoksin M1 dan eluat masing-masing pada KCKT dengan kondisi sebagai berikut:

- Kolom C18 (panjang kolom 25 cm, diameter dalam 4,6 mm) atau yang sesuai
- Fase gerak (pilih salah satu) :

No.	air	asetonitril	metanol	isopropanol
1.	75	25	-	-
2.	67	33	-	-
3.	65	25	10	-
4.	80	12	-	8

- Laju alir : 0,8 mL per menit
- Detektor : Fluoresens,  $\lambda$  Eksitasi sebesar 365 nm dan  $\lambda$  Emisi sebesar 435 nm
- Volume penyuntikan : masing-masing 50-200  $\mu\text{L}$

#### A.8.5 Cara Kerja 2 (derivatisasi dengan menggunakan *Kobra Cell*)

##### A.8.5.1 Persiapan contoh

- a) Hangatkan susu pada suhu (30 – 35)  $^{\circ}\text{C}$ ;
- b) elusikan 50 mL sampel kepada kolom IAC ( $V_s$ );
- c) biarkan seluruh sampel melewati kolom secara gravitasi dengan laju alir 1 mL/menit -3 mL/menit ;
- d) cuci kolom dengan sebanyak 2 kali menggunakan 10 mL PBS (pH 7,4);
- e) keringkan IAC dengan menggunakan sistem vakum;
- f) elusikan 2 x 0,5 mL metanol;
- g) pindahkan 0,5 mL eluat ke dalam tabung vial *autosampler*;
- h) tambahkan 0,5 mL *ultrapure water* ke dalam tabung vial dan vorteks ( $V_f$ ); dan
- i) injek 100  $\mu\text{L}$  ke dalam KCKT ( $V_i$ ).

#### A.8.6 Cara penetapan

Injek masing-masing larutan standar aflatoksin M1 dan eluat pada KCKT yang dilengkapi *Kobra Cell* dengan kondisi sebagai berikut:

- Kolom Zorbax SB-Aq
- Fase gerak : (air : asetronitril : metanol dengan perbandingan 5 : 1 : 1)  
Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  asam nitrat dan 0,3 g potassium bromide pada setiap liter fase gerak untuk *post column bromine derivatization* dengan *Kobra Cell*.
- Laju alir : 2 mL per menit
- Detektor : Fluoresens,  $\lambda$  Eksitasi sebesar 360 nm dan  $\lambda$  Emisi sebesar 440 nm
- Volume penyuntikan : masing-masing 100  $\mu\text{L}$



### A.8.6.1 Interpretasi Hasil

Perhitungan konsentrasi massa aflatoksin M<sub>1</sub> dapat menggunakan rumus sebagai berikut;

$$W_{\text{M}_1} = W_a \times \left( \frac{V_f}{V_i} \right) \times \left( \frac{1}{V_s} \right)$$

#### Keterangan:

- W<sub>m</sub> adalah volume aflatoksin M<sub>1</sub> pada sampel (ng/mL) atau (µg/mL);  
 W<sub>a</sub> adalah tinggi atau area peak aflatoksin M<sub>1</sub>;  
 V<sub>f</sub> adalah volume akhir eluat yang dilarutkan kembali (µL);  
 V<sub>i</sub> adalah volume eluat yang diinjeksi (µL); dan  
 V<sub>s</sub> adalah volume sampel yang dielusikan ke dalam kolom IAC (mL);

## A.9 Cemarkan mikroba

### A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total

#### A.9.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu (30 ± 1) °C.

#### A.9.1.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 1) °C terkalibrasi;
- oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- otoklaf;
- penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- alat penghitung koloni;
- botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor*; dan
- cawan Petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

#### A.9.1.3 Pembenihan dan pengenceran

##### a) *Buffered peptone water* (BPW)

- |                            |       |
|----------------------------|-------|
| – Peptone                  | 10 g  |
| – Natrium klorida          | 5 g   |
| – Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| – Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| – Air suling               | 1 L   |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

##### b) *Plate count agar* (PCA)

- |                                       |                       |
|---------------------------------------|-----------------------|
| – <i>Yeast extract</i>                | 2,5 g                 |
| – <i>Pancreatic digest of caseine</i> | 5 g                   |
| – Glukosa                             | 1 g                   |
| – Agar                                | 15 sampai dengan 20 g |



- Air suling 1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

#### A.9.1.4 Cara kerja

- Pipet 0,1 mL contoh, masukkan ke dalam cawan Petri steril.
- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran  $10^1$ -  $10^5$  ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu  $(45 \pm 1)$  °C dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu 30 °C selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 0,1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### A.9.1.5 Pernyataan hasil

##### A.9.1.5.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$



**Keterangan:**

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap Petri;

$n_1$  adalah jumlah Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

$n_2$  adalah jumlah Petri dari pengenceran kedua; dan

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;

– jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$   
contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6.500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5.900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan

- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu rantai, dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### A.9.1.5.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
  - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$



## Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 968.12, Sampling of Dairy Products*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 990.19, Solid (Total) in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.43.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 990.19, Solid (Total) in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.44.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 990.20, Solids-Not-Fat in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.45.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 991.20, Nitrogen (Total) in Milk*. 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.11.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 996.05, Fat in Milk, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.26.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 2000.08, Aflatoxin M1 in Liquid Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 49.3.07.

Food and Drug Administration. Bacterial Analytical Manual Online. 2003. *Food Sampling and preparation of Sample Homogenate. Chapter 1.*

ISO 4833:2003 (E). *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Technique at 30 °C.*

SNI 7385:2009, *Batas maksimum kandungan mikotoksin dalam pangan.*

SNI 7387:2009, *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*

SNI 7388:2009, *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*